

KEK×CRYO-EM ACTIVITY REPORT

VOL.2 2021年10月～2022年3月

KEKクライオ電子顕微鏡

名称 : Talos Arctica G2

加速電圧 : 200kV

電子銃 : XFEG

ステージ : AutoGrid挿入型サイドエントリーステージ

位相板 : Volta Phase Plate

旧検出器 : Falcon 3EC (*92k=1.13Å/px, 120k=0.88Å/px, 150k=0.69Å/px)

検出器 1 : Falcon 4 (*92k=1.08Å/px, 120k=0.84Å/px, 150k=0.66Å/px)

検出器 2 : Ceta 16M

制御ソフト : EPU, EPU-D

グリッド凍結装置

名称 : Vitrobot Mark IV

親水化装置

名称 : PIB-10

電流値 : soft mode = ~7mA, hard mode = ~11mA



お知らせ

2022年4月にクライオ電顕実験棟が新設されました。

2022年度中に300kVクライオ電子顕微鏡を設置予定です。

KEK×CRYO-EM
ACTIVITY REPORT
VOL.2

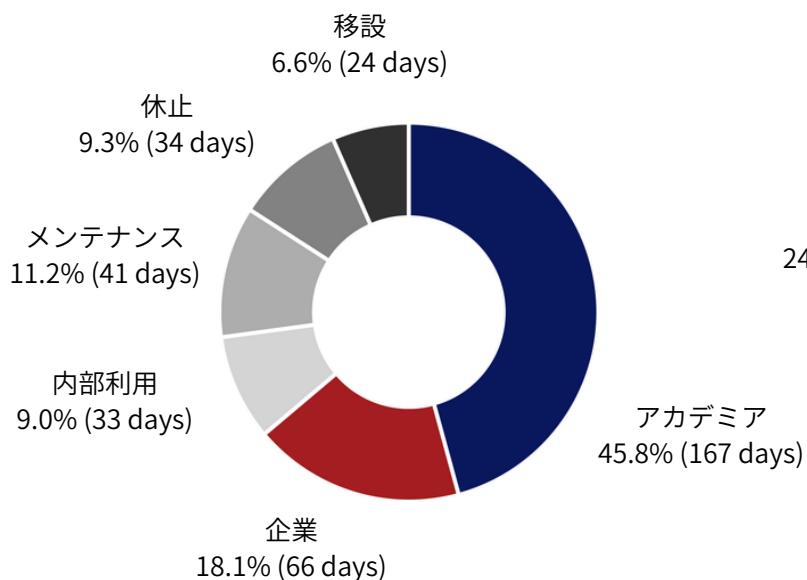
KEK

Structural Biology Research Center

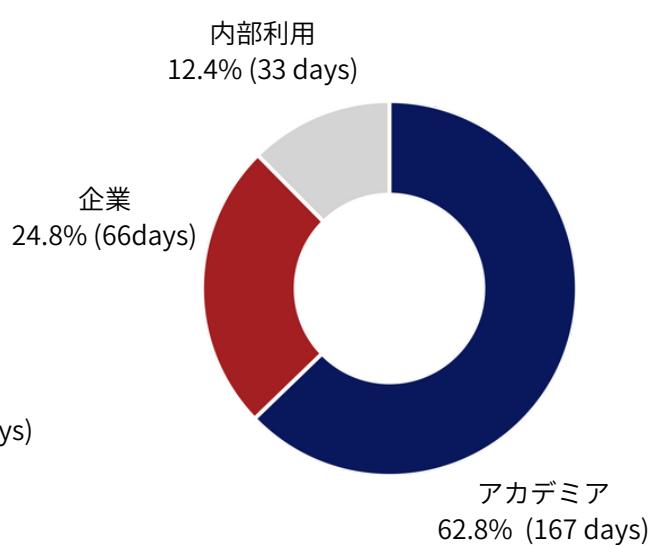
We, at the Structural Biology Research Center (SBRC), are studying about the mechanisms of biological phenomena, based on 3-D structure information. We are always looking for new students and collaborators.

KEK クライオ電顕の利用統計

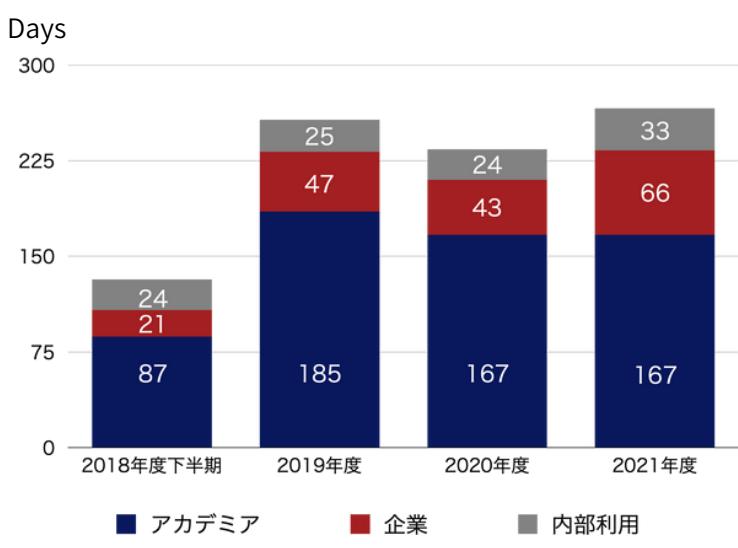
装置利用状況
2021年度年間 (365 days)



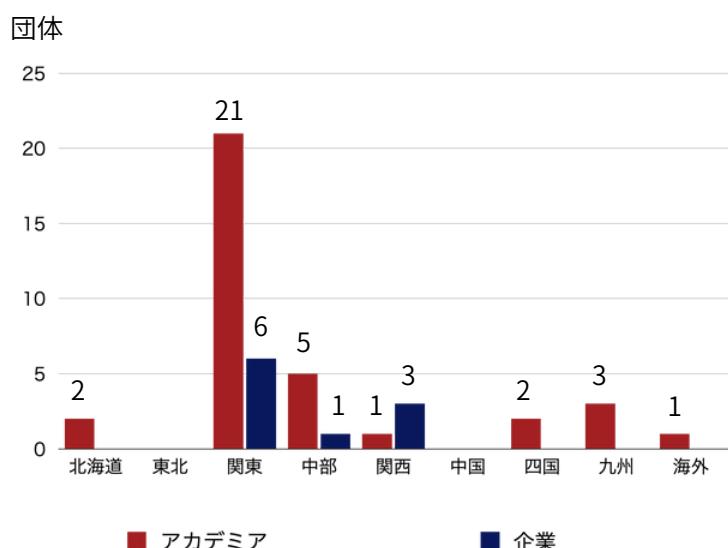
装置利用状況（稼働日のみ）
2021年度年間 (266 days)



装置稼働日におけるマシンタイム配分の推移
(2018年度下半期～2021年度)



地域別利用ユーザー数
(2021年度)



※年間算出のためVol.1の数字も含まれています。

学会参加報告

PROTEIN STRUCTURE DETERMINATION IN INDUSTRY

2021年11月8日～11月10日
オンライン開催

PSDIはヨーロッパ大手製薬企業のStructure based drug discovery (SBDD) を行う研究者の有志達が、研究推進のためnon-competitiveな研究領域についての情報シェアとネットワーキングを目的に開始されたミーティングです。1993年にZeneca(当時)がホストし第一回大会が開催されて以来今回で29回目となりました。参加する主要製薬会社が持ち回りでホストを務め毎年11月上旬頃にヨーロッパのどこかで行われます。前年はコロナ感染症のため、半日ミーティングでの短縮開催となりました。今回は通常の3日間開催でスケジュールされました。引き続き感染症の影響を考慮し、開催ホストであるMerck、EMBL（グルノーブル）、ESRFが中心となりオンラインでの開催となりました。

1) クライオ電顕施設 2) AIを取り入れたSBDD 3) 結晶構造解析の自動化 4) Integrative Structural Biology 5) Big dataのマネージメント 6) 創薬研究のケーススタディの6つのメインセッションで構成され、それに加えてスポンサーによる新技術や施設の紹介セッションがありました。また各セッション後にスピーカーとチエアーを含めたパネルディスカッションや、ネットワークのためのオンライン交流会が設けられるといった構成の3日間でした。



ここでは、各セッションについて簡単にまとめています。

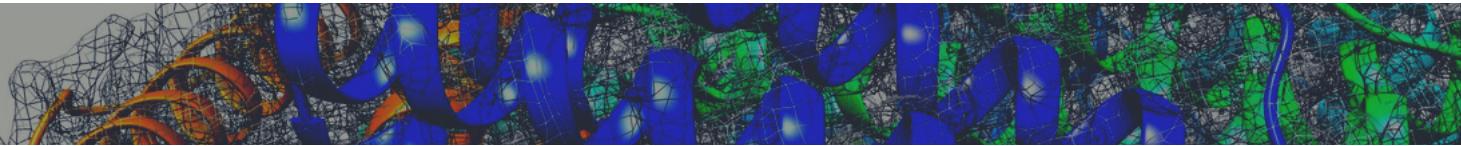
1) Cryo-EM (facilities, sample preparation, data collection and processing):

スウェーデンの国立研究所ScilifeLabのCryo-EMセンターとNovartis、またAstexやLeadXproより、各機関、各社の実験手法や解析フローについての発表がありました。特に印象に残っているのは、Novartisにはクライオ電顕を持つ研究所が4つあり、各サイトで(主にGlaciosを用いて)スクリーニングしたサンプルをBaselにあるEMヘッドオフィスに送り、Titanでデータを測定していました。CryoFLAREの開発者であるA. SchenkがNovartisに異動し、自身の開発したソフトを用いたライブ解析とデータ管理やJobの重さによって解析ワークステーションを自動で振り分けるシステム構築を行ない、構造解析を行っていました。

膜タンパク質をメインのターゲットとするLeadXProは約50kDaのPro-Macobody(nanobody+MBP)を使用し、標的タンパク質との複合体の構造解析に成功した例を発表していました。

CambridgeのCryo-EM Pharmaceuticalコンソーシアムの一員であるAstexは、Cryo-EM単粒子解析でもX線結晶構造解析に匹敵するようなスピード感でFBDDを行うため、オフラインでグリッドやホール選びを行い、測定キューに入れる事でスピードアップを図っているようです。

SciLifeLabは企業支援の仕組みやCryo-ETの解析ソフトsubTOMについての開発状況について発表を行っていました。



2) AI opportunities in SBDD:

製薬会社10社の化合物ライブラリーのデータを各社で秘匿状態を維持しながら、コンソーシアム間で機械学習に利用することができる、ヨーロッパのIMIの創薬コンソーシアムのプログラムの一つ”Melody”の学習モデルについて紹介し、プライバシーの保護と情報の無記名化また効率的な情報の収集について発表しました(AstraZeneca)。

GSKは自社のAIシステムGEMINIを活用し、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)を例にとり、ワクチン候補である抗原タンパク質の立体構造と機能をAIで探索し、その分子の生化学的評価をフローチャートと共に発表していました。

またAstraZenecaの有志によりDrug targetとなるタンパク質の発現について、発現・実験条件を最適化するアルゴリズムの確立を目指すPre-competitiveなコンソーシアムの設立についても提案がありました。

続けて基調講演として、EMBL-EBIのA.LeachよりAlphafold2(AF2)の出現や現時点でのAF2の課題との応用、またAF2の結果を活用した細胞レベルでの構造解析プロジェクトなど、その波及効果と今後の展開について考察がありました。

3) Automation and Method Development in Crystallography:

最初にヨーロッパの構造生物学の支援基盤プロジェクトである第二期iNEXT - 名称iNEXT discovery（日本でのBINDS構造解析ユニット支援事業に相当）について、その発足と今後の企業利用について指針と事業紹介がありました。EMBLグルノーブルとALPからは、結晶化のセットアップからデータ測定までを統合的に管理するCRIMSシステムを用いて、これまで困難であったLCP法で結晶化した膜タンパク質のsoakingを可能にしたことアディポネクチン受容体2(AdipoR2)の構造を例にとって明らかにしました。またEMBLハンブルグでは1 injectionにつき~75pL溶液まで調整できるスプレーを開発し、時分割測定を行う研究例の紹介、またESRFからは全自動ビームラインMassif-1の紹介、APSからはIMAT-CATより企業利用のBTについての紹介があり、これまで上市された薬剤にどのように各ビームラインが貢献してきたかを発表していました。

4) Integrative Structural Biology:

マックスプランク研究所に異動したJ. Briggsは、Cryo-ETを用いた解析により、ウイルス研究において新たにどのような発見があったのかをSARS-CoV2とHIVウイルスを例にとり発表しました。

コロナウイルスについては、Spikeタンパク質が膜に吸着する際に様々な結合様式(膜に対してのorientation angle)を取ることを発表しました。またHIVウイルスにおいては、感染細胞の細胞膜で集合しウイルスとして成長する段階でGagタンパク質の一部を構成するMAドメインが膜に結合する際に、成熟型と未成熟型で異なる形の6量体を再構成することも明らかにしました。

AstraZenecaからは、DNAの二本鎖の切断を修復するNon-homologous end joining (NHEJ)の反応機構の解明について、単粒子解析とHDX-MSのinteraction mapを用いてこれまで解析されていなかった相互作用を確定し、どのようなタンパク質が関与して複合体を形成していくかを明らかにしました。

EMBLハンブルクのSvergunからは、市販インシュリン製剤の濃度に依存した多量体の検証や、脂質とポリマーのハイブリッドナノ粒子を作製しmRNAのトランスフェクションに利用するプロジェクトについて紹介し、Integrative Structural BiologyにおいてSAXSを用いた物性解析がどのように役立つかを発表しました。

他にもJ. RappsilberはCross-linking MSを中心にCryo-ET、単粒子解析を組み合わせて、転写・翻訳を行うM. pneumoniaeのexpressome (RNAP、リボソーム、転写伸長因子等で構成される複合体)の細胞内構造を決定しました。その結果から、翻訳を阻害するとexpressomeが分離し、転写を阻害するとexpressomeが停滞・再配置するといった細胞内の複合体形成について明らかにしました。



5) Scientific data management in the era of big data:

これまでヨーロッパでは放射光施設のデータ管理にISPyBが用いられてきましたが、施設利用の際だけでなく、各研究室でのデータの管理や自動データ処理にも活用できるよう改良し、一括管理できるシステム構築について提案がありました (EMBLグルノーブルとGlobal phasing)。

R. JoostenからはPDBの構造モデルを検証し、改良するプログラムPDBredoの活用と応用例について発表がありました。実例として、PDBに登録された相同性のあるタンパク質の立体構造情報を組み合わせて、嘗てはモデルの組めなかったループ領域についても、モデル構築が可能になったと紹介がありました。

MBL-EBIのM.Varadiからは立体構造だけでなく関連する生物学的注釈まで含めたデータベース(PDBe-KB)についての紹介がありました。

6) Case studies:

J. Steyaertはこれまで構造解析に利用してきた Nanobody(約15kDa)を、単粒子解析を行う際、より大きな目印になる様に大きなタンパク(HopQ-45kDa, YgjK-86kDa)を結合させたMegobodyを作成し、単粒子解析の構造解析に成功している例を紹介しました。Diamond Light Source(DLS)のF. DelftはFBDDをより効率的に行うために作られたDLS Xchem facilityとI04ビームラインをベースにしたプラットフォームについて、イギリスで進行中の COVIDムーンショット計画の途中経過と共に発表しました。

ICRのR. Montfortはびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫において、高頻度の転座、変異を生じるドライバー遺伝子であるBcl6の阻害剤の獲得に向けて、化合物の最適化について発表がありました。結果として24b(CCT368682, CCT369260)はdegraderとして働く事が明らかになりました。

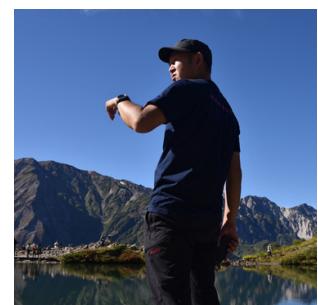
最後はDiscoidin domain receptor familyのDDR1について、DDR1とDDR2の選択制を持つ阻害剤の発見について発表があり、DELT screening (DNA-encodeした低分子スクリーニング)についてもその概要が話されました。



3日間通して、Drug discoveryにおけるクライオ電顕による構造解析（単粒子解析、Cryo-ET共に）の確立と、AF2を含むAIを今後どのように活用していくのか？また複雑な生命現象、Big dataをどのように処理するのか？という課題が、2021年においては製薬会社でのホットな話題であるという印象を受けました。（次回はSanofiとThermo fisherがホストし、2023年10月23日～25日にオランダのアントフォーヘンにて開催予定であることが発表されました。）

田辺 幹雄

たなべみきお /
高エネルギー加速器研究機構
構造生物学研究センター
特任准教授



興味ある研究分野
細菌が引き起こす感染症や薬剤耐性のメカニズム

KEKクライオ電顕を利用して出版された論文 2021年10月から2022年3月まで

KEKユーザーとの共同研究の成果

- C-Glycoside metabolism in the gut and in nature: Identification, characterization, structural analyses and distribution of C-C bond-cleaving enzymes.

Mori, T., Kumano, T., He, H., Watanabe, S., Senda, M., Moriya, T., Adachi, N., Hori, S., Terashita, Y., Kawasaki, M., Hashimoto, Y., Awakawa, T., Senda, T., Abe, I., and Kobayashi, M. *Nature Commun.* 12, 6294 (2021).
EMDB-30808@2.85Å (PDB:7drd)
EMDB-30809@2.54Å (PDB:7dre)

東京大学 阿部 & 森グループとの共同研究。化学的に安定なC-グリコシド結合を切断する腸内細菌由来の脱グリコシル酵素について、クライオ電顕単粒子解析とX線結晶解析それぞれによって得られたタンパク質の立体構造を合わせて発表しました。クライオ電顕では2種類の酵素について 2.85 Åおよび2.54Åという高分解能のマップが得られ、結晶構造との違いを詳細に比較することが出来ました。

- Non-conventional octameric structure of C-phycocyanin.

Minato, T., Teramoto, T., Adachi, N., Hung, N.K., Yamada, K., Kawasaki, M., Akutsu, M., Moriya, T., Senda, T., Ogo, S., Kakuta, Y., and Yoon, K.S. *Commun. Biol.* 4, 1238 (2021).
EMDB-31090@3.06Å (PDB:7eh8) (EMPIAR-11079)
EMDB-31089@3.71Å (PDB:7eh7) (EMPIAR-11079)

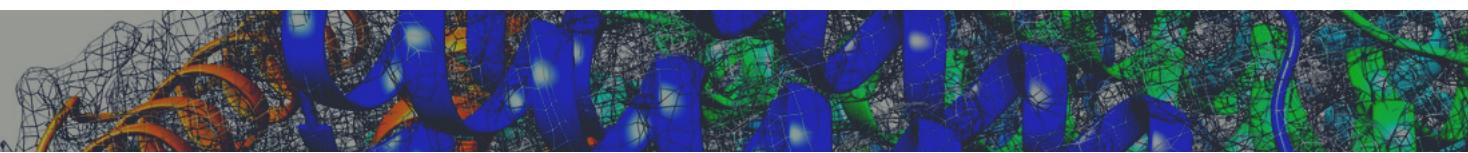
九州大学 角田グループ・尹グループとの共同研究。シアノバクテリアの光合成色素タンパク質フィコシアニン(CPC)は、結晶構造から6量体であることが知られていましたが、日本の温泉から単離したシアノバクテリア CPCの結晶構造は8量体でした。そこでKEKクライオ電顕で確認したところ6量体と8量体が混在することが分かりました。その後6量体の結晶構造解析にも成功し、クライオ電顕単粒子解析とX線結晶解析それぞれによって得られたタンパク質の立体構造を合わせて発表することが出来ました。同一試料に含まれる複数の構造を分離して解析できるクライオ電顕の強みが発揮されました。

KEKユーザーによる施設利用の成果

- Syntheses and aggregation properties of new squalene receptors bearing open chain ligands.

Linh, N.T., Arimura, T., Tominaga, K., Kigoshi, H., and Isoda, H. *Supramolecular Chemistry* 33, 194-201 (2021).

産総研 有村グループの研究成果。新規スクアレン受容体が自己集合して出来るベシクル構造について、KEKクライオ電顕を用いて確認しました。ベシクルサイズが0.1-0.4 μmと大きいため、通常の単粒子解析よりも倍率を下げるグリッドのホール全体が映るようにし、位相板を使って測定を行いました。



KEK 構造生物学研究センター(SBRC) クライオ電子顕微鏡

KEKクライオ電子顕微鏡施設は以下3点をミッションとして、Thermo Fisher Scientific社の200kVクライオ電子顕微鏡 Talos Arctica G2 (Falcon 4) を運用しています。

1. アカデミア/企業ユーザーへのマシンタイム提供（年間200日以上）
2. グリッド凍結/データ測定の支援（必要に応じた単粒子解析支援）
3. クライオ電顕を用いた実験に関する技術導入の支援



➤ 1週間の流れ

月:メンテナンス
火:1日枠 (スクリーニング&本測定800枚)
水:1日枠 (スクリーニング&本測定800枚)
木:1日枠 (スクリーニング&本測定800枚)
金土日:3日枠 (スクリーニング&本測定3000枚)

➤ 1日の流れ

9:30 集合・Grid-prepに関する打ち合わせ
9:45 実験開始
午前 グリッド凍結 (6枚以内)
午後 スクリーニング測定 (1枚あたり約1時間)
18:00頃～ overnight/over weekendの測定開始
解散

翌日以降 KEKスタッフがデータをコピーして返送

➤ 当日の持ち物

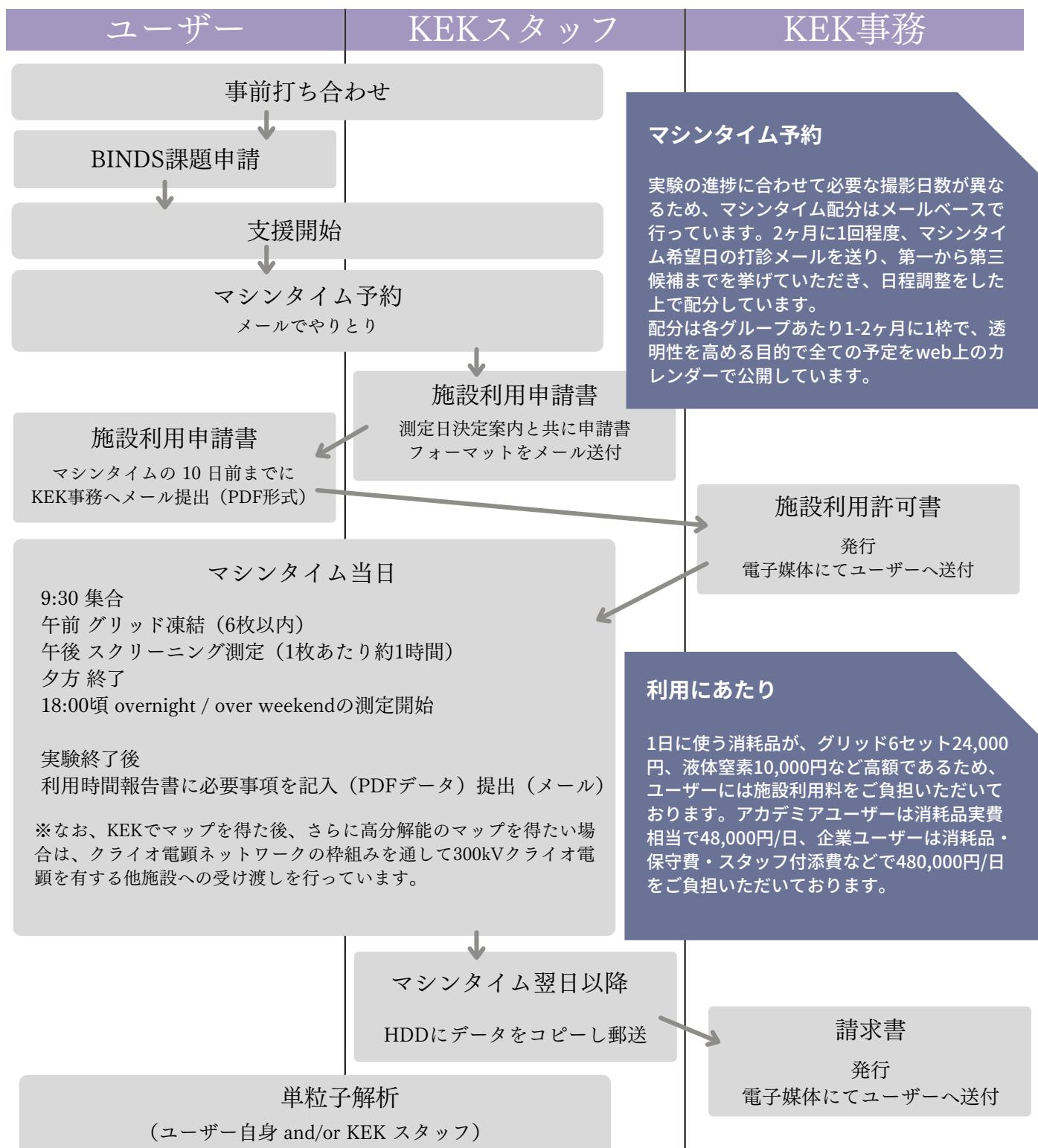
サンプル
希釀用buffer
4~8TBのHDD

KEK クライオ電顕利用の流れ

KEK クライオ電顕の利用は、アカデミアユーザーは BINDS 経由で、企業ユーザーは共同研究契約・学術指導契約などの枠組みで可能です。

アカデミアユーザーの初回利用までの流れは「事前打ち合わせ → BINDS 課題申請 → 支援開始 → マシンタイム配分 → マシンタイム当日」が一般的です。実験の進捗に合わせて必要となる撮影日数が異なるため、マシンタイム配分はメールベースで行っています。

2ヶ月に1回程度、KEK からユーザー宛にマシンタイム希望日の打診メールを送り、第一から第三候補までを挙げていただき、日程調整をした上でマシンタイムを配分しています。配分は各グループあたり1-2ヶ月に1枠で、透明性を高める目的で全ての予定を KEK クライオ電顕の web site で公開しています。



クライオ電顕利用料金

アカデミア

データ測定

<1日枠>2,000円 x 9h または 24h = 18,000円 または 48,000円

<3日枠>2,000円 x 72h = 144,000円

企 業

データ測定

<1日枠>10,000円 x 24h = 240,000円

<3日枠>10,000円 x 72h = 720,000円

測定解析補助・指導業務

30,000円x 8h = 240,000円

初期解析（オプション）

125,000円 x 日数

詳細解析（オプション）

250,000円 x 日数

アカデミア以外の測定利用合計

<1日枠>480,000円

<3日枠>960,000円

KEK×CRYO-EM
ACTIVITY REPORT
VOL.2

KEK IMSS
Structural Biology Research Center

We, at the Structural Biology Research Center (SBRC), are studying about the mechanisms of biological phenomena, based on 3-D structure information. We are always looking for new students and collaborators.



KEK クライオ電顕メンバー

千田 俊哉
川崎 政人
守屋 俊夫
安達 成彦 (～2022.03)
池田 聰人
久保田 孝幸
中山 友希子
山本 美里
山田 悠介
篠田 晃
鮭川 理恵子
増田 千穂

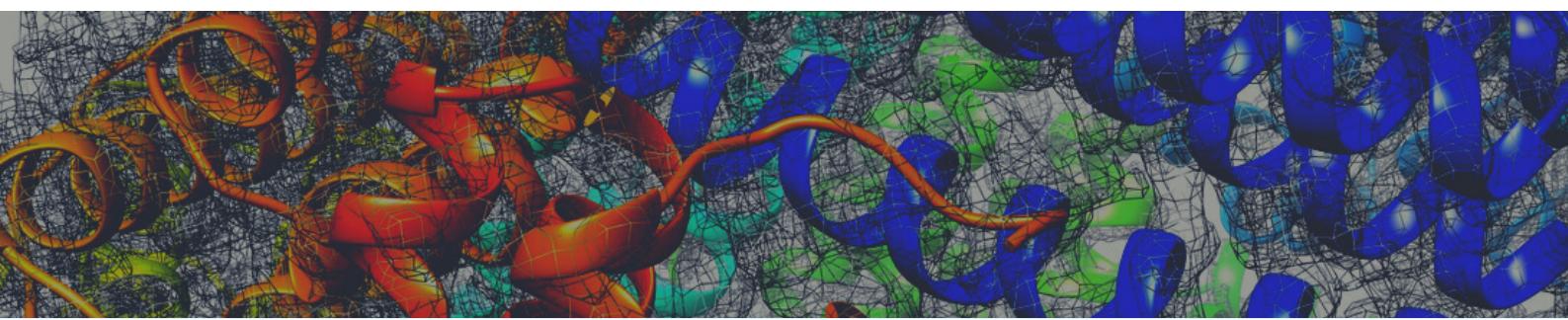
編集後記

KEK×CRYO-EM ACTIVITY REPORTをお手に取っていただき、ありがとうございます。
KEKクライオ電顕に特化した冊子のVOL.2が出来上がりしました。この冊子が何号も継続して皆様にお届けできるように制作していきたいと思っております。
継続するといえば、私はハワイやフラ（ダンス）が好きで、フラを始めてからは12年が経ちました。私にとってハワイやフラは、なくてはならない自分の一部になっています。この冊子が皆様にとって、なくてはならないものになるのには時間がかかるかもしれませんのが、お役に立てたら嬉しいです。

そして、この場を借りて制作に協力して下さった皆様にお礼を申し上げます。
次号は、2022年4月に新設されたクライオ電顕実験棟の特集となります！お楽しみに。
今後ともKEKクライオ電顕を宜しくお願ひいたします。

A HUI HOU!(ハワイ語でまた会いましょうの意味です)

増田



KEK×CRYO-EM ACTIVITY REPORT

VOL.2 2021年10月～2022年3月

高エネルギー加速器研究機構
物質構造科学研究所
構造生物学研究センター(SBRC)



〒305-0801
茨城県つくば市大穂1-1

<https://www2.kek.jp/imss/sbrc/beamline/cryoem.html>